

Aus dem Biochemischen Institut
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. Hj. Staudinger

**Kinetische Untersuchungen zu den Reaktionen
zwischen Cytochrom b_5 , L(+)-Ascorbinsäure
und Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät
der
Justus Liebig-Universität
Gießen

vorgelegt von
Friedrich Bernhard Everling
aus Nidda

Gießen 1971

Aus dem Biochemischen Institut
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. Hj. Staudinger

**Kinetische Untersuchungen zu den Reaktionen
zwischen Cytochrom b₅, L(+)-Ascorbinsäure
und Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät
der
Justus Liebig-Universität
Gießen

vorgelegt von
Friedrich Bernhard Everling
aus Nidda

Gießen 1971

Dekan: Professor Dr. E. Habermann

Referent: Professor Dr. Hj. Staudinger

Korreferent: Professor Dr. L. Rôka



INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	
1. Einleitung	1
1.1. Cytochrom b_5	1
1.2. Ascorbinsäure	2
1.3. Mikrosomales Elektronentransportsystem	4
2. Material und Methoden	7
2.1. Substanzen	7
2.2. Präparation der Mikrosomen	7
2.3. Herstellung eines Mikrosomenaufschlusses	8
2.4. Proteinbestimmung	8
2.5. Bestimmung von Cytochrom b_5	9
2.6. Erzeugung von Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure	9
2.7. Ansätze	
2.8. Reaktionsgeschwindigkeit	10
3. Ergebnisse	11
3.1. Reduktion von Cyt b_5 durch ASH_2	11
3.1.1. Ausmaß der Reduktion	11
3.1.2. Reaktionsordnung	12
3.1.3. pH-Optimum	13
3.1.4. Proteinabhängigkeit	13
3.1.5. Abhängigkeit von der ASH_2 -Konzentration	15
3.1.6. Abhängigkeit von der Cyt b_5 -Konzentration	17
3.2. Oxydation von reduziertem Cyt b_5 durch ASH^+	19
3.2.1. Reaktionsordnung	20
3.2.2. pH-Optimum	21
3.2.3. Proteinabhängigkeit	22
3.2.4. Abhängigkeit von der ASH^+ -Konzentration	25
3.2.5. Abhängigkeit von der Cyt b_5 -Konzentration	31
3.2.6. Temperaturabhängigkeit	32
3.2.7. Einfluß mikrosomaler Lipide und des Cytoplas-	33
3.2.8. Einfluß einer Dialyse auf Mikrosomen	35
3.2.9. Einfluß von Katalase	35
3.2.10. Einfluß von Komplexbildnern, Quecksilber(II)- Ionen und p-Chloromercuribenzoat	35
3.2.11. Versuche mit D(-)-Ascorbinsäure und Dehydro-D(-)-ascorbinsäure	36

4.	Diskussion	38
4.1.	Redoxverhalten von ASH_2 und ASH^+	38
4.2.	Reduktion und Oxydation von Cyt b_5	38
4.2.1.	Nicht enzymatische Reaktionen	38
4.2.2.	Enzymatische Reaktionen	39
4.3.	Beziehung zum mikrosomalen Elektronen-transport	40
5.	Zusammenfassung	42
	Literaturverzeichnis	43

Verwendete Abkürzungen

ASH_2	= L(+)-Ascorbinsäure
ASH^-	§ L(+)-Ascorbat
ASH^+	= Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure
AS	= Dehydro-L(+)-ascorbinsäure
NADH	= reduziertes Nicotinsäureamid- adenindinukleotid
Cyt b_5	= Cytochrom b_5
i- ASH_2	= D(-)-Ascorbinsäure
i- ASH^+	= Semidehydro-D(-)-ascorbinsäure
i-AS	= Dehydro-D(-)-ascorbinsäure

1.

EINLEITUNG

Der mikrosomale Elektronentransport ist ein kompliziertes, verzweigtes System verschiedener Reaktionswege unter Beteiligung mehrerer Flavo- und Haemoproteide. Als die Funktion dieses Systems sei erwähnt die Hydroxylierung von Steroiden und Pharmaka sowie die Fettsäuredesaturierung (28). Unklar geblieben sind bis heute die Funktionen von Cytochrom b_5 und Ascorbinsäure. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit einem Teilgebiet des mikrosomalen Elektronentransports, in dem sowohl Cytochrom b_5 als auch L(+)-Ascorbinsäure beteiligt sind.

1.1. Cytochrom b_5

Die Mikrosomenfraktion einer Reihe tierischer Organe mit hoher Stoffwechselleistung enthält das Haemoprotein Cytochrom b_5 in großer Konzentration. Als ein weiteres Cytochrom der b-Gruppe, die erstmals 1940 von KEILIN und HARTREE (1) beschrieben wurde, lokalisierten STRITTMATTER und BALL (2) dieses Haemoprotein 1952 in der Mikrosomenfraktion von Rattenlebern. Sie zeigten, daß es sich durch eine α -Bande bei 557nm auszeichnet, und nannten es zunächst Cytochrom m. Es zeigte sich eine starke spektrale Ähnlichkeit mit dem von PAPPENHEIMER und WILLIAMS (3) Cytochrom b_5 genannten Pigment im Mitteldarm von Cecropia-Larven. Endgültig wurde durch CHANCE und WILLIAMS (4) allgemein die Bezeichnung Cytochrom b_5 eingeführt. Reines Cytochrom b_5 aus Leber zu isolieren, das als Bestandteil des Endoplasmatischen Retikulums in der Mikrosomenfraktion fest an Lipoproteinpartikel gebunden vorliegt, gelang erstmals 1958 STRITTMATTER und VELICK (5), später auch

GARFINKEL (6). KRISCH und STAUDINGER (44) konnten Cytochrom b_5 aus Nebennierenrinde isolieren; im Gegensatz zu früheren Beobachtungen (2,45) gelang RAW et al (7) die Isolation auch aus Lebermitochondrien. Die Darstellung in kristalliner Form (46,12), sowie die Analyse der Aminosäuresequenz (41) ist inzwischen gelungen. Das Molekulargewicht ist noch Gegenstand der Diskussion: während für ein oligomeres Nativ-Cytochrom b_5 (13) ein Wert von 25 000 angegeben wird, liegen die Werte der anderen Autoren zwischen 11 000 und 17 000 (5,6,7,8, 9,10,11,12).

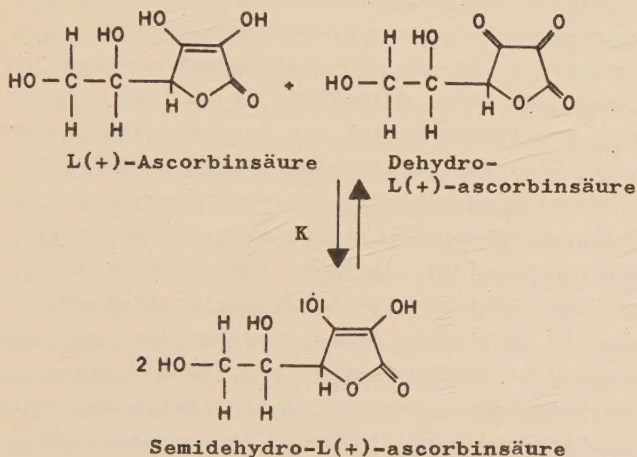
Das Reduktions- und Oxydationsverhalten des Einelektronendonators bzw. -akzeptors (14) wurde von CHANCE und WILLIAMS (4) sowie von KLINGENBERG (15) untersucht und beschrieben. Cytochrom b_5 läßt sich in Anwesenheit der Flavoproteid-Reduktasen der Mikrosomenfraktion durch reduzierte Pyridinnukleotide (NADH und NADPH) reduzieren (9,16) und wird durch Cytochrom c im Testsystem der NADH-Cytochrom b_5 -Oxydoreduktase reoxydiert (16). Die spektralen und chemischen Eigenschaften sind somit heute weitgehend geklärt, wohingegen die Diskussion um die biologische Funktion des Cytochrom b_5 (9) noch offen bleiben muß; insbesondere die Frage nach dem normalen Akzeptor für die Elektronen des reduzierten Cytochrom b_5 ist ungelöst.

1.2. Ascorbinsäure

L(+)-Ascorbinsäure läßt sich in Anwesenheit von Metallkatalysatoren oder Enzymen leicht zu Dehydro-L(+)-ascorbinsäure oxydieren. Dieser Prozeß ist reversibel.

Bei der Oxydation bildet sich zunächst durch einen Einelektronenschritt das instabile semichinonähnliche Radikal Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure. Auf die Existenz dieses Radikals wurde in den Arbei-

ten mit pflanzlichen Enzymen von KERN und RACKER (18) sowie NASON et al (19) und in tierischem Gewebe von STAUDINGER et al (20) geschlossen. Durch die Elektronenspinresonanzmessungen ist die Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure zuerst von YAMAZAKI et al (21) nachgewiesen worden. Für die Entstehung dieses Radikals durch eine Komproportionierungsreaktion von L(+)-Ascorbinsäure mit Dehydro-L(+)-ascorbinsäure



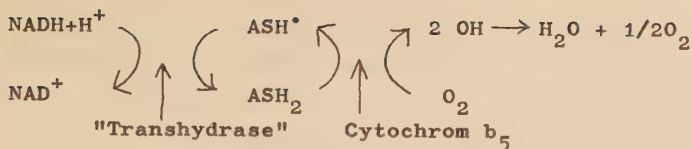
konnten von v.FOERSTER, WEIS und STAUDINGER (22) die Massenwirkungskonstanten bei verschiedenen pH-Werten anhand von ESR-Messungen bestimmt werden. Diese Werte erlauben es, exakte Angaben über die Konzentration des Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure-Radikals bei bekannten Konzentrationen von L(+)-Ascorbinsäure und Dehydro-L(+)-ascorbinsäure zu machen. Zum Redoxverhalten des Radikals konnte weiter gezeigt werden (23), daß der Elektronenübergang vom Ascorbinat-Monoanion auf verschiedene Elektronenakzeptoren meßbar nur durch das erste Elektron erfolgt und daß die gebildete Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure ihr zweites Elektron auf ein zweites Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure-Molekül überträgt und damit zu L(+)-Ascorbinsäure und

Dehydro-L(+)-ascorbinsäure disproportioniert.

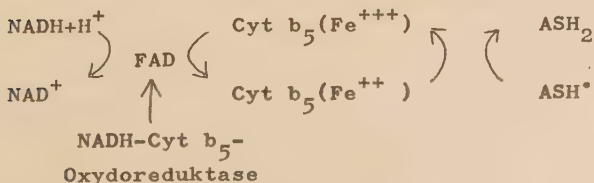
1.3. Mikrosomales Elektronentransportsystem

Die Redoxeigenschaften der Ascorbinsäure und die Tatsache, daß hohe Konzentrationen der oxydierten und reduzierten Form in Pflanzen- und Tiergeweben mit hoher metabolischer Aktivität gefunden werden, ließ SZENT-GYÖRGYI schon 1931 eine Beteiligung der L(+)-Ascorbinsäure bei den Elektronentransportketten der Zelle vermuten (17).

Im Pflanzengewebe hält ein System oxydierender und reduzierender Enzyme den L(+)-Ascorbinsäure-Spiegel aufrecht (24). STAUDINGER et al (20) konnten in tierischem Gewebe ein spezifisches Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure-abhängiges NADH-Oxydationssystem nachweisen und lokalisierten es in der Mikrosomenfraktion von Rattenleber und -niere. Dieses später (35) als NADH: Semidehydro-L(+)-ascorbat-Oxydoreduktase (EC 1.6.5.4.) bezeichnete Enzym, das in geringerer Konzentration auch in Mitochondrien beobachtet wurde (46), konnte kinetisch charakterisiert werden (35,48). Dehydro-L(+)-ascorbinsäure kann in diesem System wie auch in Pflanzen nicht als Akzeptor für Elektronen von NADH dienen. Eine Beteiligung der L(+)-Ascorbinsäure an Hydroxylierungsreaktionen über dieses Enzym ist diskutiert worden (20). Katalytische Mengen an L(+)-Ascorbinsäure unterhalten einen Reaktionsablauf, bei dem das Radikal über das zunächst (25) als "Transhydrase" bezeichnete Enzym mit Hilfe von NADH zu L(+)-Ascorbinsäure reduziert wird. Cytochrom b_5 wurde die Funktion einer terminalen Oxidase in Mikrosomen zugeschrieben, durch die L(+)-Ascorbinsäure wiederum zu Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure oxydiert würde, wie das folgende Schema erkennen läßt.



Da eine deutliche Beschleunigung der NADH-Oxydation auch ohne L(+)-Ascorbinsäure durch Zusatz von Cytochrom b_5 zu Mikrosomen erfolgt (25), muß als ein anderer Weg die direkte Reduktion von Cytochrom b_5 durch NADH über die NADH-Cytochrom b_5 -Oxydoreduktase (EC 1.6.2.2.) von STRITTMATTER und VELICK (16) angenommen werden. Befunde von FRUNDER et al (26) wiesen auf eine andere Stellung von Cytochrom b_5 und Ascorbinsäure im mikrosomalen Elektronentransport hin, wobei aber in diesen Arbeiten die Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure als wesentlicher Reaktionspartner noch nicht erkannt wurde. In späteren Arbeiten von STAUDINGER et al (27) wurde vermutet, daß Cytochrom b_5 , welches über die NADH-Cytochrom b_5 -Oxydoreduktase (16) reduziert wird, seine Elektronen auf Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure überträgt und diese zu L(+)-Ascorbinsäure reduziert. So kann als Funktion dieses Elektronentransports die Möglichkeit der Zelle angesehen werden, die resorbierbare Form des Vitamin C, das unpolare Molekül der Dehydro-L(+)-ascorbinsäure, in die metabolisch aktive Form, die L(+)-Ascorbinsäure, zu überführen und diese reduziert zu halten. Dieses System kann als "Vitamin C-Sparmechanismus" bezeichnet werden.



Der letzte Schritt dieser möglichen Elektronentransportkette, nämlich die Oxydation des reduzierten Cytochrom b_5 durch Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure blieb allerdings hypothetisch und ist bisher nicht näher beschrieben worden. Losgelöst von dem Problem, inwieweit hier ein Teilschritt der ascorbinsäureabhängigen NADH-Oxydation vorliegt, untersucht diese Arbeit insbesondere die kinetischen Daten dieser Reaktion.

Daß Cytochrom b_5 durch L(+)-Ascorbinsäure teilweise reduziert werden kann, ist von mehreren Autoren bereits erwähnt worden: Während RAW et al (7) fanden, daß reines Cytochrom b_5 im Gegensatz zu nicht gereinigtem Cytochrom b_5 nicht durch L(+)-Ascorbinsäure reduziert wird, stellten KRISCH und STAUDINGER (25) eine Reduktion bis zu neun Prozent des isolierten Cytochrom b_5 fest. OSHINO et al (28) berichteten von etwa 20%iger Reduktion des Cytochrom b_5 , ohne allerdings genauere Angaben über die Versuchsbedingungen zu machen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Substanzen

Trishydroxymethylaminomethan, NADH und Katalase (Fa. C.F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim), ASH_2 p.a., Salzsäure p.a., Titriplex III = EDTA-Na_2 p.a., Quecksilber(II)-nitrat p.a., Natrium-diaethyl-dithiocarbamat p.a., Kaliumchlorid p.a., Natriumchlorid p.a. (Fa. E. Merck AG, Darmstadt), Dinatriumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat nach SØRENSEN, Natriumhydroxyd p.a. und Natriumdithionit gereinigt (Fa. Riedel de Haen, Seelze bei Hannover), Eumulgin 286^R= Alkylaryl-polyglykolaether (Deutsche Hydrierwerke GmbH, Düsseldorf), p-Chloromercuribenzoat C-grade (Fa. Calbiochem, Los Angeles, USA) waren Handelsprodukte.

AS wurde nach dem von STAUDINGER und WEIS (29) angegebenen Verfahren gereinigt.

Cytochrom b_5 wurde nach dem von POLTORATZKY-BOIS und CHAIX (30) angegebenen Verfahren, modifiziert nach LUMPER (31), isoliert*. Weitgehend gereinigte NADH-Cyt b_5 -Oxydoreduktase wurde in Anlehnung an das von TAKESUE und OMURA (32) beschriebene Verfahren hergestellt. Die Reinigung erfolgte bis einschließlich des von STRITTMATTER und VELICK (33) angegebenen Schritt '5'.

2.2. Präparation der Mikrosomen

Für die Gewinnung der Mikrosomen wurden die Lebern von 200 bis 250g schweren weiblichen Wistar-Ratten verwendet. Die Tiere wurden mit Altromin-Standardfutter für Ratten (Fa. Altromin, Lage/Lippe) gefüttert und erhielten Wasser ad libitum.

Die Isolierung der Mikrosomen erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von SCHNEIDER und HOGEBOOM (34). Die Lebern wurden einmal mit 20ml eiskalter

*Für die freundliche Überlassung von isoliertem Cyt b_5 danke ich Herrn Dr.Dr.L.Lumper

isotoner Kochsalzlösung perfundiert und dann mit dem Scherblatthomogenisator Ultraturrax (TP 18/2, Fa. Janke und Kunkel, Staufen/Br.) unter Eiskühlung im Verhältnis 1 : 5 (g/ml) in einem Medium aus 0,25m Saccharose in 0,02m Tris-Puffer von pH 7,4 zerkleinert. Anschließend wurde diese Suspension im Homogenisator nach POTTER und ELVEJHEM ca. 30sec unter Eiskühlung homogenisiert. Dann wurden Kerne und Mitochondrien durch Zentrifugieren (10 800g; 30min; 4°C) entfernt. Danach wurde durch Mull filtriert, um Fett zu entfernen. Bei 27000g, 30min, 4°C wurde eine Zwischenfraktion abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde nochmals durch Mull filtriert und dann zur Gewinnung der Mikrosomenfraktion bei 105 000g, 60min, 4°C ultrazentrifugiert. Durch dieses Vorgehen wurde die Mikrosomenfraktion weitgehend von restlichem Haemoglobin befreit. Das Sediment wurde jeweils in dem gewünschten Puffer aufgenommen.

2.3. Herstellung eines Mikrosomenaufschlusses

Für zahlreiche Messungen verwendeten wir einen Eumulgin 286^R-Aufschluß, der auf folgende Weise in Anlehnung an frühere Untersuchungen (35) hergestellt wurde: Die Mikrosomenfraktion wird zuletzt in 0,1m Tris-Puffer von pH 9,0 aufgenommen und mit 1 % Eumulgin 286 versetzt. Danach wird eine Stunde bei 4°C inkubiert und dann zentrifugiert (105 000g; 60min; 4°C). Das Präzipitat wird verworfen. Für Messungen bei kleineren pH-Werten als pH 9,0 wird der klare Überstand mit gesättigter Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung, für Messungen bei höheren pH-Werten mit 1n NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

2.4. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Präpara-

tionen erfolgte nach der von GORNALL et al (36) modifizierten Biuret-Methode.

2.5. Bestimmung von Cytochrom b_5

Die Messung der Konzentrationsänderung von reduziertem Cytochrom b_5 erfolgte immer bei 25°C mit einem Aminco-Chance Dual Wavelength-Spectrophotometer mit angeschlossenem Schreiber (Fa. Aminco, Silver Spring, Maryland, USA) durch Messung der Extinktionsdifferenz zwischen 424nm und 409nm Wellenlänge. Für die Bestimmung der einzelnen Reaktionsgeschwindigkeiten wurde jeweils die Anfangsgeschwindigkeit ausgewertet. Nach MODIRZADEH und KAMIN (37) wurde der Extinktionskoeffizient von 164 cm²/mMol für reduziertes Cytochrom b_5 zugrunde gelegt.

2.6. Erzeugung von Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure

Die ASH^+ entsteht durch Komproportionierung aus ASH_2 und AS (22). Die ASH^+ -Konzentration wird bestimmt mit Hilfe der Gleichung :

$$[ASH^+] = \sqrt{K [ASH_2] \cdot [AS]}$$

Für K wurden die von v.FOERSTER et al (22) bestimmten Werte herangezogen; für pH 6,4 der Wert von $K = 5,1 \cdot 10^{-9}$.

Da ASH_2 in den Versuchen in ca. 10^4 fachem und AS in ca. 10^3 fachem molarem Überschuß gegenüber Cyt b_5 vorliegt, können die Konzentrationen dieser Komponenten über die ausgewertete Reaktionszeit als konstant betrachtet werden.

2.7. Ansätze

Die Ansätze hatten immer ein Endvolumen von 3ml. Wenn nicht anders angegeben, lagen die Konzentrationen für ASH_2 bei $10^{-2}M$, für AS bei $4 \cdot 10^{-3}M$. Es wurde in 0,1M Phosphatpuffer nach SØRENSEN bei einem pH-Wert von 6,4 gearbeitet, um ASH_2 und AS

möglichst stabil zu halten, gleichzeitig aber nicht zu weit von physiologischen pH-Werten zu liegen. Es wurden Proteinkonzentrationen um 0,5 bis 1 mg/ml im Ansatz verwendet. Außer bei den Versuchen zur Temperaturabhängigkeit hatten die Ansätze immer eine Temperatur von $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.8. Reaktionsgeschwindigkeiten

Die Reaktionsgeschwindigkeiten werden zum Teil als spezifische Aktivitäten angegeben:

$$\frac{\text{nM Cyt } b_5 \text{ red/ox}}{\text{min} \cdot \text{mg Protein}}$$

Bei Versuchen mit Zusatz von isoliertem Cyt b_5 zu Mikrosomen wird auf den Gesamtgehalt an Cyt b_5 bezogen:

$$\frac{\Delta \text{Cyt } b_5 \text{ red/ox}}{\text{min} \cdot \text{Cyt } b_5 \text{ ges}}$$

3.

ERGEBNISSE

3.1. Reduktion von Cyt b_5 durch ASH_2

3.1.1. Ausmaß der Reduktion

Cyt b_5 läßt sich abhängig vom pH-Wert des Ansatzes in verschiedenem Ausmaß mit ASH_2 reduzieren. Bei konstantem pH-Wert wird das Ausmaß der Reduktion des Cyt b_5 durch die ASH_2 -Konzentration im Ansatz bestimmt. Dies gilt sowohl für isoliertes Cyt b_5 als auch für Cyt b_5 in Mikrosomen oder aufgeschlossenen Mikrosomen. Abb.1 zeigt das Ausmaß der Reduktion von Cyt b_5 in $10^{-2}M$ Ascorbinatlösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Ansatzes.

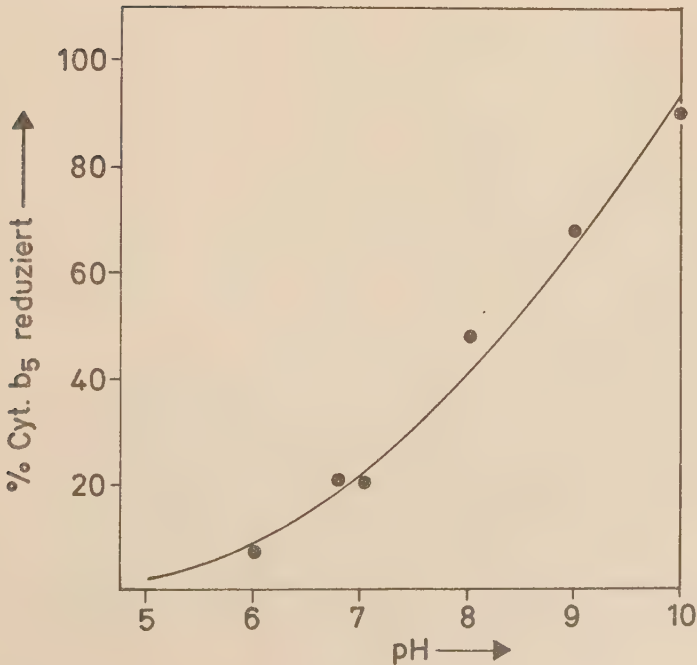


Abb. 1: Bestimmung des Ausmaßes der Reduktion von Cyt b_5 (isoliert, in Mikrosomen und aufgeschlossenen Mikrosomen) in Abhängigkeit vom pH-Wert
 $0,6 \cdot 10^{-6} \text{ M Cyt } b_5$; 10^{-2} M ASH_2 ; $0,1 \text{ M Phosphatlösungen}$; Proteingehalt der Mikrosomenansätze $0,6-1,4 \text{ mg/ml}$

3.1.2. Reaktionsordnung

In Abb. 2 wird gezeigt, daß die Reduktion von isoliertem Cyt b_5 durch ASH_2 dem Gesetz einer Reaktion zweiter Ordnung gehorcht.

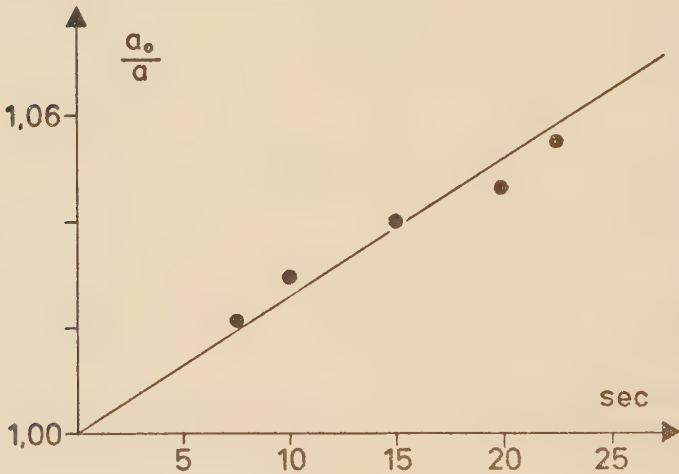


Abb. 2: Bestimmung der Reaktionsordnung der Reduktion von isoliertem Cyt b_5 durch ASH_2
 a_0 = Konzentration des oxydierten Cyt b_5 zu Beginn der Reaktion; a = Konzentration des oxydierten Cyt b_5 zu einem beliebigen Zeitpunkt nach Beginn der Reduktionsreaktion
 $0,37 \cdot 10^{-6} \text{ M Cyt } b_5$; 10^{-2} M ASH_2 ; in $5 \cdot 10^{-2} \text{ M Phosphatpuffer}$; pH 7,0

3.1.3. pH-Optimum

Das pH-Optimum für die Reduktion von Cyt b_5 in aufgeschlossenen Mikrosomen durch ASH_2 ist nur umständlich zu bestimmen, da die Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen pH-Werten von der insgesamt reduzierbaren Menge an Cyt b_5 abhängig sind, die sich, wie Abb. 1 zeigt, nach dem pH-Wert richtet. Daher wurde bei den Reduktionsversuchen beim bestimmbareren pH-Optimum der Oxydation des durch NADH reduzierten Cyt b_5 durch ASH^+ gearbeitet, das zwischen pH 6,4 und pH 6,7 liegt (s. Abb. 10).

3.1.4. Proteinabhängigkeit

Die Reduktionsgeschwindigkeit zeigt eine lineare Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im Ansatz (Abb. 3).

Da eine Steigerung der Mikrosomenkonzentration im Ansatz gleichzeitig eine Steigerung der Cyt b_5 -Konzentration mit sich bringt, mußte bei der Bestimmung der Proteinabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten eine konstante Cyt b_5 -Konzentration theoretisch erzielt werden, indem die Konzentrationsänderung des reduzierten Cyt b_5 pro Zeiteinheit auf die Gesamt-Cyt b_5 -Konzentration bezogen wird:

$$\frac{\Delta \text{Cyt } b_5 \text{ red}}{\text{min} \cdot \text{Cyt } b_5 \text{ ges}}$$

Bei allen Versuchsanordnungen mit isoliertem Cyt b_5 und mit Gemischen aus mikrosomal gebundenem und isoliertem Cyt b_5 in verschiedenen Verhältnissen wird eine Vergleichbarkeit der Werte für die Reaktionsgeschwindigkeiten erreicht, indem ebenfalls auf die Gesamt-Cyt b_5 -Konzentration bezogen wird.

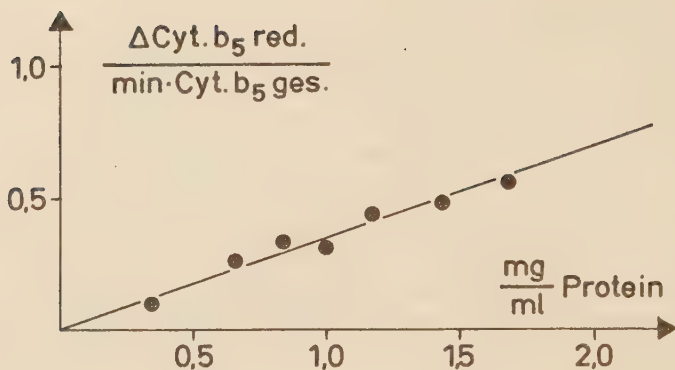


Abb. 3: Bestimmung der Proteinabhängigkeit der Reduktion von Cyt b_5 in aufgeschlossenen Mikrosomen durch ASH_2
 $0,3-1,5 \cdot 10^{-6}$ M Cyt b_5 ; 10^{-2} M ASH_2 ; 0,1M Phosphatpuffer; pH 6,4

Isoliertes Cyt b_5 wird durch ASH_2 nur langsam reduziert. Erst durch Zusatz geringer Mengen mikrosomalen Proteins zu isoliertem Cyt b_5 wird es mit einer Geschwindigkeit der gleichen Größenordnung reduziert wie Cyt b_5 , das in mikrosomal gebundener Form vorliegt. Es besteht auch hier eine direkte Abhängigkeit der Reduktionsgeschwindigkeit von der Konzentration der zugesetzten Mikrosomen und aufgeschlossener Mikrosomen, wie Abb.4 zeigt.

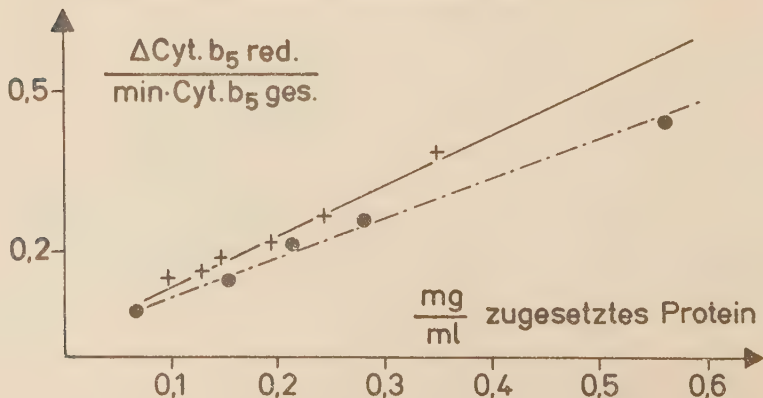


Abb. 4: Abhängigkeit der Reduktion des isolierten Cyt b_5 durch ASH_2 von der Proteinkonzentration der zugesetzten Mikrosomen(●●●) und der aufgeschlossenen Mikrosomen(+++) $0,5 \cdot 10^{-6} M$ Cyt b_5 (isoliert); $10^{-2} M$ ASH_2 ; $0,1 M$ Phosphatpuffer; pH 6,4

3.1.5. Abhängigkeit der Reduktionsgeschwindigkeit von der ASH_2 -Konzentration

Wird bei der Reduktion von isoliertem Cyt b_5 die ASH_2 -Konzentration variiert, so ändert sich linear abhängig davon die Reduktionsgeschwindigkeit (Abb.5).

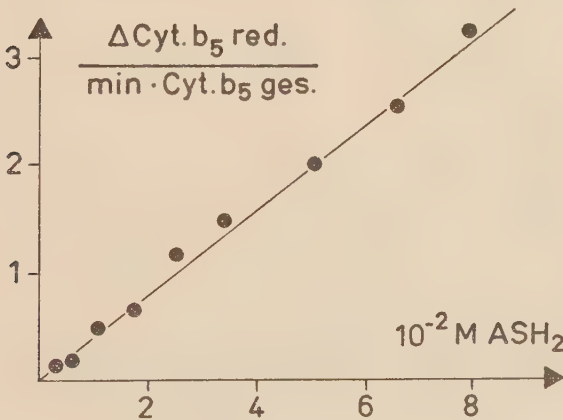


Abb. 5: Abhängigkeit der Reduktionsgeschwindigkeit von isoliertem Cyt b_5 von der ASH_2 -Konzentration $0,55 \cdot 10^{-6} M$ Cyt b_5 (isoliert); $0,2-8,0 \cdot 10^{-2} M$ ASH_2 ; $0,1 M$ Phosphatpuffer; pH 8,0

Demgegenüber zeigt sich, daß die Reduktionsgeschwindigkeit von Cyt b_5 in aufgeschlossenen Mikrosomen bei Erhöhung der ASH_2 -Konzentration einem Sättigungswert zustrebt. Anhand der Auftragungsweise nach LINEWEAVER und BURK läßt sich aus

WEAVER und BURK zu. Es ergibt sich aus Abb. 8 für die scheinbare K_M für Cyt b_5 ein Wert von $5 \cdot 10^{-6} M$.

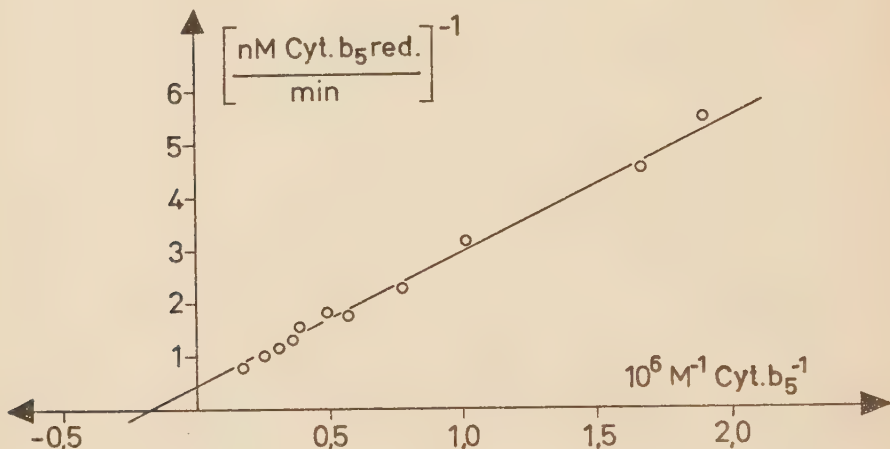


Abb. 8: Bestimmung einer scheinbaren K_M für Cyt b_5 bei der Reduktion von Cyt b_5 durch ASH_2 .
 $0,5-5,5 \cdot 10^{-6} M$ Cyt b_5 (isoliert); $0,5 \cdot 10^{-6} M$ Cyt b_5 in aufgeschlossenen Mikrosomen ($0,46 \text{ mg/ml}$ Protein); $0,1 M$ Phosphatpuffer; pH 6,4; $10^{-2} M$ ASH_2

Die Messungen sowohl der Reduktion von Cyt b_5 durch ASH_2 als auch bei der nun zu besprechenden ASH° -abhängigen Oxydation von Cyt b_5 , welches durch ASH_2 reduziert worden ist, wurden vorwiegend in aufgeschlossenen Mikrosomen vorgenommen. Sie konnten in nichtaufgeschlossenen Mikrosomen für das mikrosomal gebundene Cyt b_5 nicht genügend genau durchgeführt werden, da hier die spezifischen Aktivitäten zu hoch liegen und dadurch eine genaue Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten nicht möglich ist. Der Zeitraum für die Zugabe des reduzierenden bzw. oxydierenden Agens, in dem eine

Registrierung der Extinktionsänderung nicht möglich ist, konnte nicht klein genug gehalten werden. Eine weitere Verdünnung der Mikrosomen hätte auch die Cyt b_5 -Konzentration so weit sinken lassen, daß die Empfindlichkeit der Apparatur nicht mehr für auswertbare Messungen ausgereicht hätte.

3.2. Oxydation von reduziertem Cyt b_5 durch ASH^+

Wenn Cyt b_5 durch ASH_2 reduziert worden ist, läßt es sich durch ASH^+ zum großen Teil wieder oxydieren. Da bei der Zugabe von AS zu einem Ansatz mit Cyt b_5 und ASH_2 durch Komproportionierung ASH^+ in bekannter Konzentration entsteht, setzt die Oxydation des mit ASH_2 reduzierten Cyt b_5 sofort nach Zusatz von AS ein. Die Reaktion verläuft bis zu einem bestimmten Verhältnis von reduziertem zu oxydiertem Cyt b_5 , welches dem Verhältnis des Redoxpaares ASH^-/ASH^+ entspricht. Um zu prüfen, ob nicht auch AS als Elektronenakzeptor für reduziertes Cyt b_5 wirken kann, wurde Cyt b_5 in aufgeschlossenen und nicht-aufgeschlossenen Mikrosomen mit NADH reduziert ($0,6 \cdot 10^{-6} M$ Cyt b_5 ; $6,7 \cdot 10^{-6} M$ NADH; $0,1 M$ Phosphatpuffer; pH 6,4) und mit AS ($4 \cdot 10^{-3} M$ AS) versetzt. Es zeigte sich, daß reduziertes Cyt b_5 durch AS in Abwesenheit von ASH_2 nicht oxydiert wird.

Auch in Gegenwart von ASH^+ wird Cyt b_5 durch mindestens stöchiometrische Konzentrationen an NADH vollständig reduziert. Es kommt aber sehr schnell zur raschen Oxydation. Die Geschwindigkeit ist leicht zu bestimmen, da kein Zeitintervall für die nachträgliche Zugabe des die Oxydation auslösenden Reagens verstreichen muß. Durch die Zugabe von ASH_2 und AS ist ASH^+ von vornherein im Ansatz enthalten.

Die Oxydation des Cyt b_5 durch ASH^+ beginnt in dem Augenblick, in dem NADH vollständig oxydiert ist; diese Tatsache wurde schon früher festgestellt (26), ohne aber die Rolle der ASH^+ zu erkennen.

Die vor der Oxydation notwendige Reduktion von Cyt b_5 läßt sich auch durch Natriumdithionit erzielen. Allerdings ist ein etwa 1000facher molarer Überschuß an Natriumdithionit gegenüber isoliertem und mikrosomal gebundenem Cyt b_5 notwendig, um eine vollständige Reduktion zu erreichen. Wegen dieses hohen Überschusses und weil Reaktionen mit den schnell entstehenden Zerfallsprodukten von Natriumdithionit nicht auszuschließen sind, wurden nur wenige Untersuchungen mit diesem Reduktionsmittel zu orientierenden Zwecken durchgeführt.

3.2.1. Reaktionsordnung

Entsprechend den Feststellungen für die Reduktion von Cyt b_5 durch ASH_2 geht aus Abb. 9 hervor, daß die Oxydation von isoliertem Cyt b_5 durch ASH^+ den Gesetzmäßigkeiten einer Reaktion zweiter Ordnung folgt.

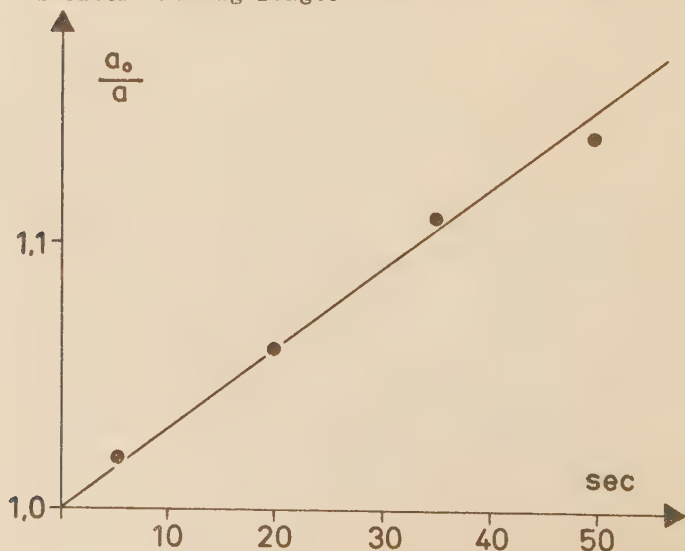


Abb. 9: Bestimmung der Reaktionsordnung für die Oxydation von Cyt b_5 durch ASH^+

a_0 = Konzentration von reduziertem Cyt b_5 zu Beginn der Reaktion; a = Konzentration von reduziertem Cyt b_5 zu einem beliebigen Zeitpunkt nach Beginn der Reaktion
 $0,37 \cdot 10^{-6} M$ Cyt b_5 (isoliert); $10^{-2} M$ ASH_2 ;
 $5 \cdot 10^{-2} M$ Phosphatpuffer; pH 7,0

3.2.2. pH-Optimum

Der pH-Wert des Ansatzes beeinflusst die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Oxydation von Cyt b_5 durch ASH^+ . Aus Abb. 10 läßt sich ein pH-Optimum für diese Reaktion in aufgeschlossenen Mikrosomen erkennen, das zwischen pH 6,4 und 6,7 liegt. Alle Experimente mit Mikrosomen und aufgeschlossenen Mikrosomen wurden bei pH 6,4 durchgeführt, da für diesen Wert die Gleichgewichtskonstante für die Komproportionierungsreaktion am genauesten bekannt ist und gleichzeitig etwa im pH-Optimum gearbeitet werden konnte.

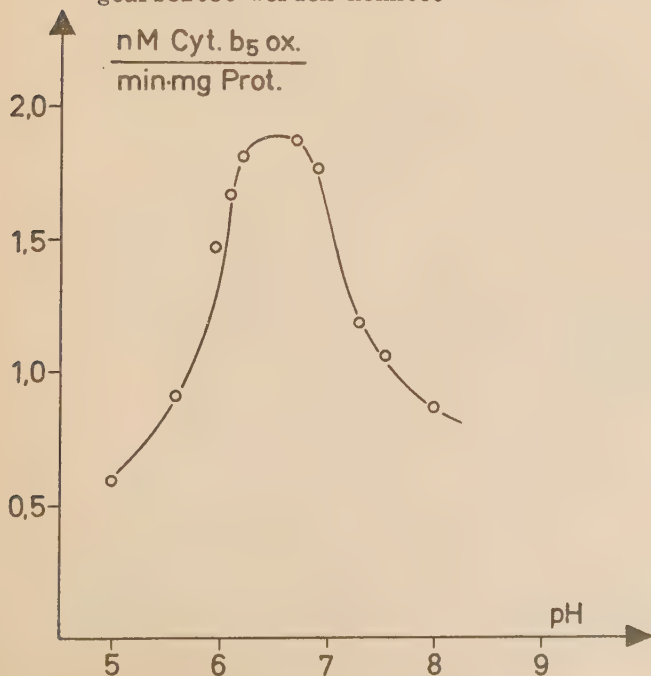


Abb.10: Bestimmung des pH-Optimums der Oxydation von Cyt b_5 durch ASH^+
 $0,9 \cdot 10^{-6} M$ Cyt b_5 in aufgeschlossenen Mikrosomen ($0,82 mg/ml$ Protein); $10^{-2} M$ ASH_2 ; $4 \cdot 10^{-3} M$ AS; $3,3 \cdot 10^{-6} M$ NADH;
 $0,1 M$ Phosphatpuffer

3.2.3. Proteinabhängigkeit

Die Proteinkonzentration im Ansatz bestimmt auch bei der Oxydation von Cyt b_5 durch ASH^+ direkt proportional die Reaktionsgeschwindigkeit, die auf konstante Cyt b_5 -Konzentration bezogen ist. Abb. 11 zeigt die linearen Abhängigkeiten in verschiedenen Versuchsreihen mit Protein der einzelnen Mikrosomenpräparationen und mit ASH_2 , NADH und Natriumdithionit als Reduktionsmittel.

Auch die Geschwindigkeit der Oxydation von isoliertem Cyt b_5 durch ASH^+ ist von der Menge des zugesetzten Proteins aus Mikrosomen oder aufgeschlossenen Mikrosomen abhängig. Geringe Zusätze dieser Proteinpräparationen ermöglichen wesentlich höhere Reaktionsgeschwindigkeiten als bei isoliertem Cyt b_5 ohne Zusatz mikrosomalen Proteins. Bei den Versuchsreihen in Abb. 12 wurde isoliertes Cyt b_5 mit verschiedenen Konzentrationen von Mikrosomen oder aufgeschlossenen Mikrosomen versetzt und jeweils mit ASH_2 oder NADH reduziert. Es zeigt sich wieder die lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Proteinkonzentration.

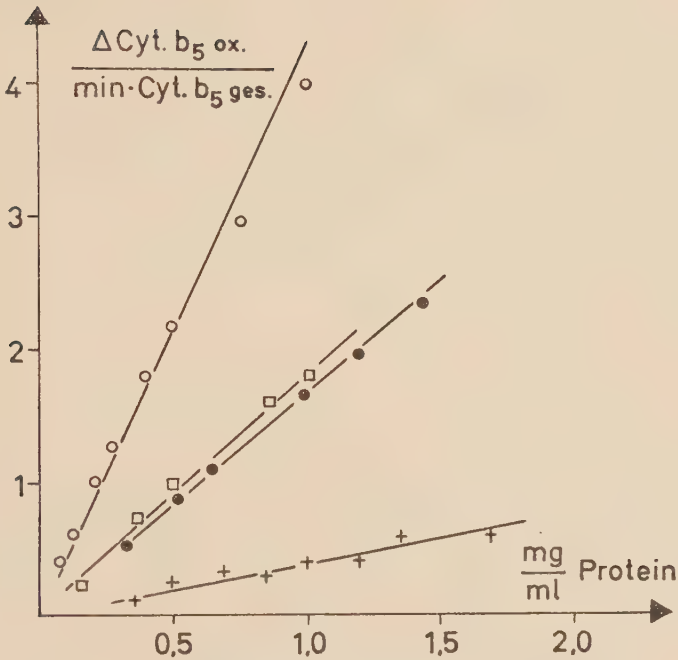


Abb. 11: Bestimmung der Proteinabhängigkeit der Oxydation von Cyt b_5 durch ASH^+

(●●●) $0,3-1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M Cyt } b_5$ (aufgeschlossene Mikrosomen), vorher reduziert mit NADH ($3,3 \cdot 10^{-6} \text{ M NADH}$)

(+++) $0,3-1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M Cyt } b_5$ (aufgeschlossene Mikrosomen), vorher reduziert mit ASH_2

(ooo) $0,04-0,5 \cdot 10^{-6} \text{ M Cyt } b_5$ (mikrosomal), vorher reduziert mit NADH ($1,7 \cdot 10^{-6} \text{ M NADH}$)

(□□□) $0,1-0,5 \cdot 10^{-6} \text{ M Cyt } b_5$ (mikrosomal), vorher reduziert mit Natriumdithionit ($5 \cdot 10^{-4} \text{ M Natriumdithionit}$)

immer: 10^{-2} M ASH_2 ; $4 \cdot 10^{-3} \text{ M AS}$; $0,1 \text{ M Phosphatpuffer}$; pH 6,4

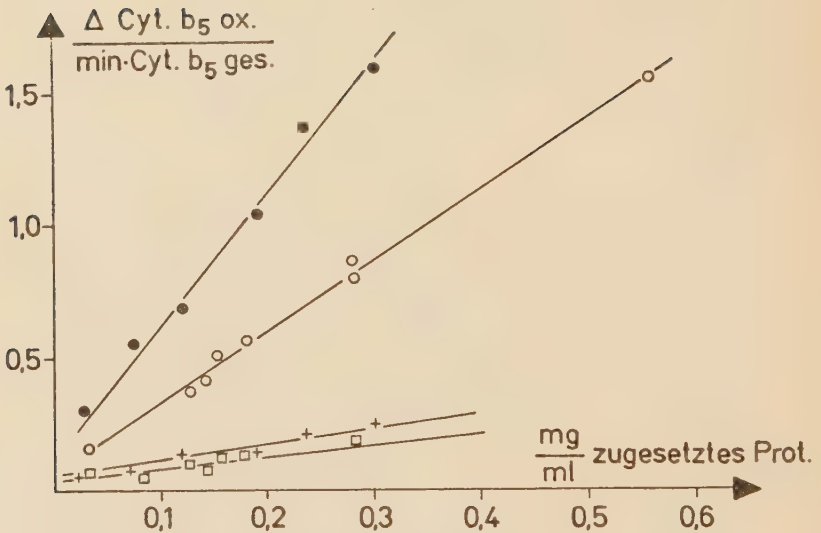


Abb.12: Abhängigkeit der Oxydation von isoliertem Cyt b_5 durch ASH^* von der Proteinkonzentration der zugesetzten Mikrosomen (●●●) mit aufgeschlossenen Mikrosomen, vorher reduziert mit NADH ($1,7 \cdot 10^{-6} \text{ M NADH}$) (+++) mit aufgeschlossenen Mikrosomen, vorher reduziert mit ASH_2 (ooo) mit Mikrosomen, vorher reduziert mit NADH ($1,7 \cdot 10^{-6} \text{ M NADH}$) (□□□) mit Mikrosomen, vorher reduziert mit ASH_2
 immer: $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ M Cyt } b_5$ (isoliert);
 10^{-2} M ASH_2 ; $4 \cdot 10^{-3} \text{ M AS}$;
 $0,1 \text{ M Phosphatpuffer}$; pH 6,4

3.2.4. Abhängigkeit von der ASH^+ -Konzentration

Die Geschwindigkeit der Oxydation von isoliertem Cyt b_5 durch ASH^+ steht in einem linearen Abhängigkeitsverhältnis von der ASH^+ -Konzentration. Da diese Versuche (wie auch diejenigen in Abb. 5) bei pH 8,0 vorgenommen wurden, um eine auswertbare Reaktionsgeschwindigkeit zu erzielen, werden in Abb. 13 nur relative Konzentrationseinheiten für ASH^+ angegeben.

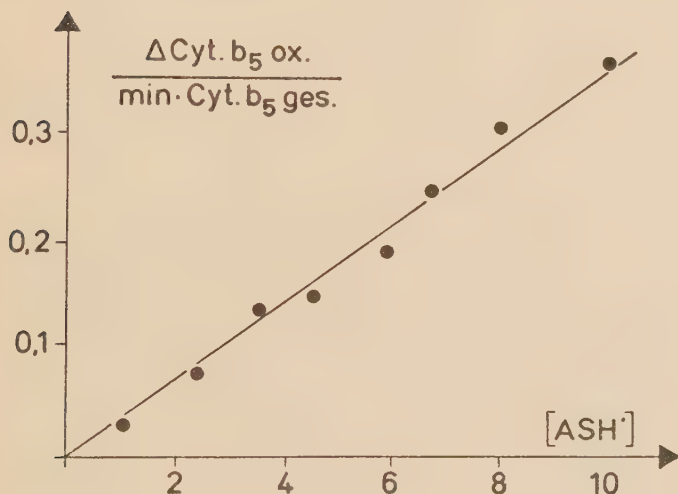


Abb.13: Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Oxydation von isoliertem Cyt b_5 durch ASH^+ von der ASH^+ -Konzentration (in relativen Einheiten)
 $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ M Cyt } b_5$ (isoliert); $10^{-2} \text{ M } ASH_2$;
 $0,4 - 12 \cdot 10^{-3} \text{ M AS}$; $0,1 \text{ M Phosphatpuffer}$;
 pH 8,0

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen mit isoliertem Cyt b_5 zeigt sich, daß die Geschwindigkeit der Oxydation von Cyt b_5 in den verschiedenen mikrosomalen Präparationen bei Steigerung der ASH^+ -

Konzentration einem Sättigungswert zustreht. Dies ließ wiederum die Bestimmung einer scheinbaren MICHAELIS-Konstanten nach dem Verfahren von LINEWEAVER und BURK zu. Es ergibt sich für die ASH^+ -Konzentration in allen Versuchen ein Wert von $10^{-6}M$ als scheinbare K_M . Wie aus Abb. 14 ersichtlich, ändert sich die Maximalgeschwindigkeit je nach der Konzentration der für die vorherige Reduktion zugesetzten ASH_2 , die ja die Konzentration des reduzierten Cyt b_5 bestimmt. Die scheinbare K_M für ASH^+ wird weder durch verschiedene ASH_2 -Konzentrationen noch durch eine Veränderung des pH-Wertes geändert (Abb. 14).

Wird Cyt b_5 in Mikrosomen oder aufgeschlossenen Mikrosomen zunächst mit NADH reduziert, so kann die durch ASH^+ ausgelöste Oxydation vom vollständig reduzierten Cyt b_5 -Gehalt im Ansatz ausgehen. In diesem Fall ist die Anfangsoxydationsgeschwindigkeit unabhängig von der ASH_2 -Konzentration. Sie wird bestimmt durch die ASH^+ -Konzentration, gleichgültig aus welchem Verhältnis von ASH_2 zu AS die ASH^+ entsteht. Abb. 15 zeigt die gleiche scheinbare K_M von $10^{-6}M$ für ASH^+ bei der Oxydationsreaktion in Mikrosomen und aufgeschlossenen Mikrosomen, bei verschiedenem pH-Wert und mit verschiedenen Reduktionsmitteln.

Aus den Abbildungen 16 und 17 geht hervor, daß auch in Gemischen aus isoliertem Cyt b_5 und Cyt b_5 in den mikrosomalen Präparationen die gleiche scheinbare K_M für ASH^+ von $10^{-6}M$ bei der Oxydation von reduziertem Cyt b_5 erhalten wird. Abb. 16 zeigt die Bestimmung einer scheinbaren K_M in einem Gemisch aus Cyt b_5 in aufgeschlossenen Mikrosomen und isoliertem Cyt b_5 im Verhältnis von 1 : 1 bei vorheriger Reduktion mit ASH_2 bzw. NADH.

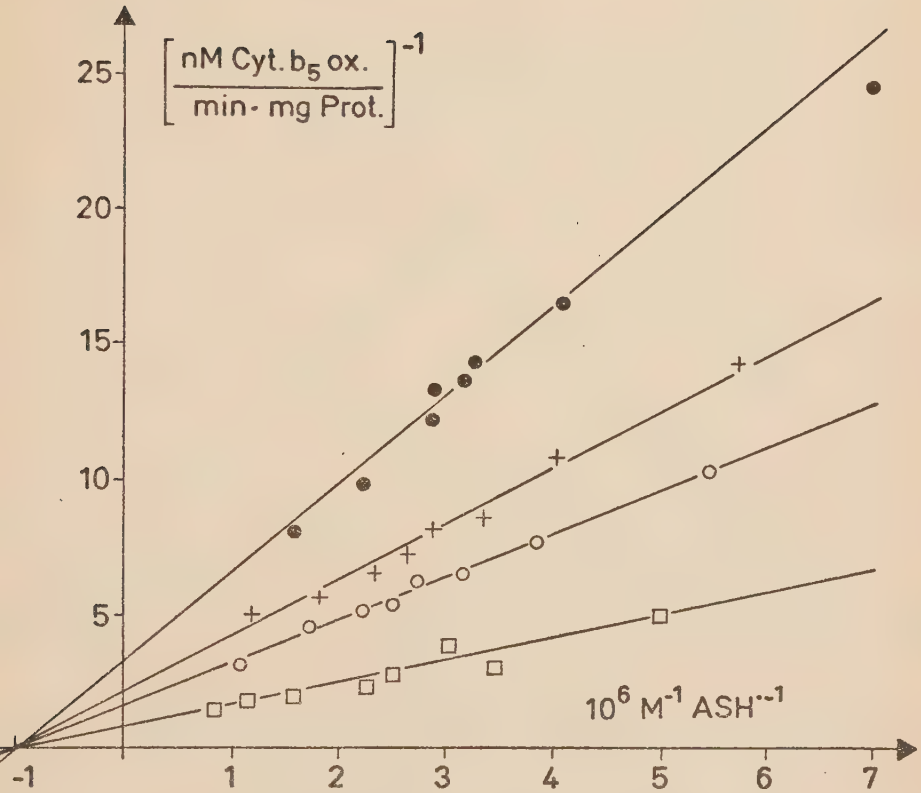


Abb.14: Bestimmung einer scheinbaren K_M für die Oxydation des mit ASH_2 reduzierten Cyt b_5 in aufgeschlossenen Mikrosomen durch ASH_2^+ unter Veränderung der verwendeten ASH_2 -Konzentration und des pH-Wertes
 (●●●) 10^{-2} M ASH_2 ; pH 6,4
 (+++) $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ M ASH}_2$; pH 6,4
 (ooo) $1,7 \cdot 10^{-2} \text{ M ASH}_2$; pH 6,4
 (□□□) 10^{-2} M ASH_2 ; pH 7,4
 immer: $0,9 \cdot 10^{-6} \text{ M Cyt b}_5$ in aufgeschlossenen Mikrosomen (1,3mg/ml Protein);
 $0,4-8,0 \cdot 10^{-3} \text{ M AS}$; $0,1 \text{ M Phosphatpuffer}$;

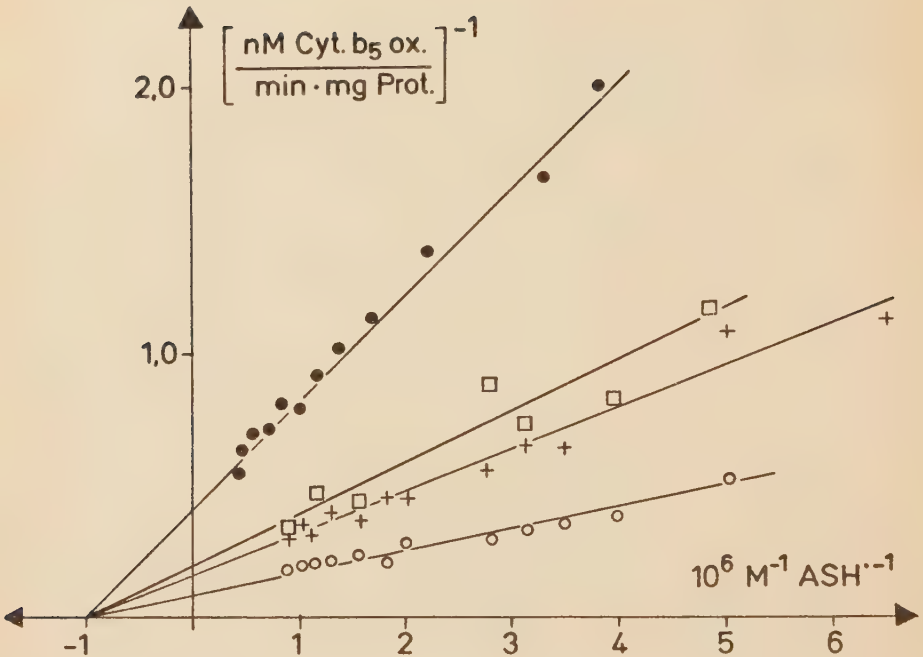


Abb.15: Bestimmung einer scheinbaren K_M für ASH^+ in Mikrosomen und aufgeschlossenen Mikrosomen, bei verschiedenem pH-Wert und NADH und Natriumdithionit als Reduktionsmittel

(●●●) $0,6 \cdot 10^{-6} M$ Cyt b_5 in aufgeschlossenen Mikrosomen ($0,67 mg/ml$ Protein);

$1,7 \cdot 10^{-6} M$ NADH; $0,4-24 \cdot 10^{-3} M$ AS; pH 6,4

(ooo) $0,6 \cdot 10^{-6} M$ Cyt b_5 (mikrosomal: $0,9 mg/ml$ Protein); $1,7 \cdot 10^{-6} M$ NADH; $0,4-24 \cdot 10^{-3} M$ AS; pH 6,4

(+++) $0,6 \cdot 10^{-6} M$ Cyt b_5 (mikrosomal: $0,9 mg/ml$ Protein); $1,7 \cdot 10^{-6} M$ NADH; $0,4-24 \cdot 10^{-3} M$ AS; pH 7,4

(□□□) $0,9 \cdot 10^{-6} M$ Cyt b_5 (mikrosomal: $1,7 mg/ml$ Protein); $10^{-3} M$ Natriumdithionit;

$0,4-12 \cdot 10^{-3} M$ AS; pH 6,4

immer: $10^{-2} M$ ASH_2 ; $0,1 M$ Phosphatpuffer

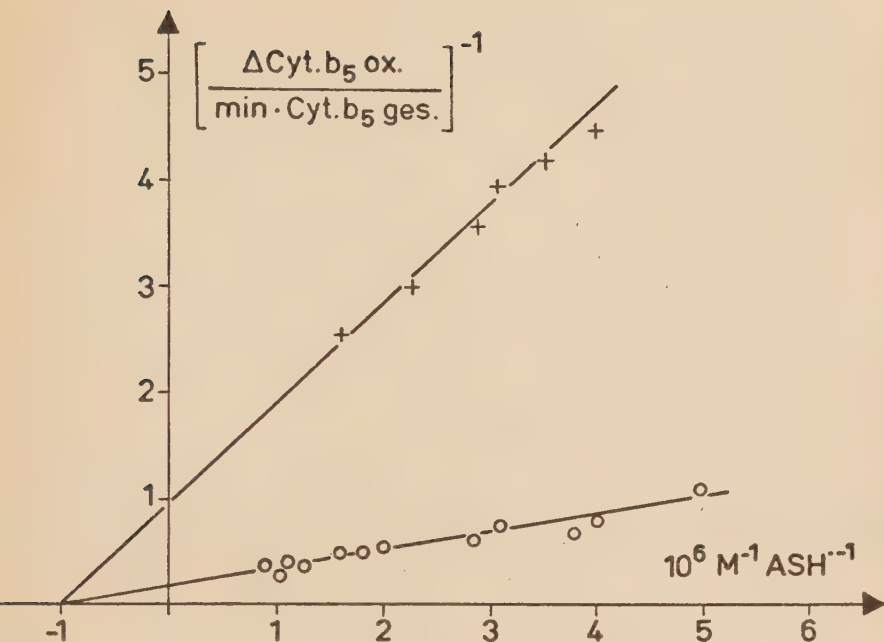


Abb.16: Bestimmung einer scheinbaren K_M für ASH° im Gemisch aus isoliertem Cyt b_5 und aufgeschlossenen Mikrosomen
 $0,6 \cdot 10^{-6} \text{ M Cyt b}_5$ (isoliert);
 $0,6 \cdot 10^{-6} \text{ M Cyt b}_5$ (in aufgeschlossenen Mikrosomen: $0,72 \text{ mg/ml Protein}$);
 10^{-2} M ASH_2 ; $0,4\text{--}12 \cdot 10^{-3} \text{ M AS}$; $0,1 \text{ M Phosphatpuffer}$; $\text{pH } 6,4$
 (ooo) vorherige Reduktion mit NADH ($1,7 \cdot 10^{-6} \text{ M NADH}$)
 (+++) vorherige Reduktion mit ASH_2

In Abb.17 wird das Verhältnis von isoliertem Cyt b_5 zu Cyt b_5 in Mikrosomen variiert; wiederum ohne Einfluß auf den Wert der scheinbaren MICHAELIS-Konstanten von 10^{-6} M für ASH° .

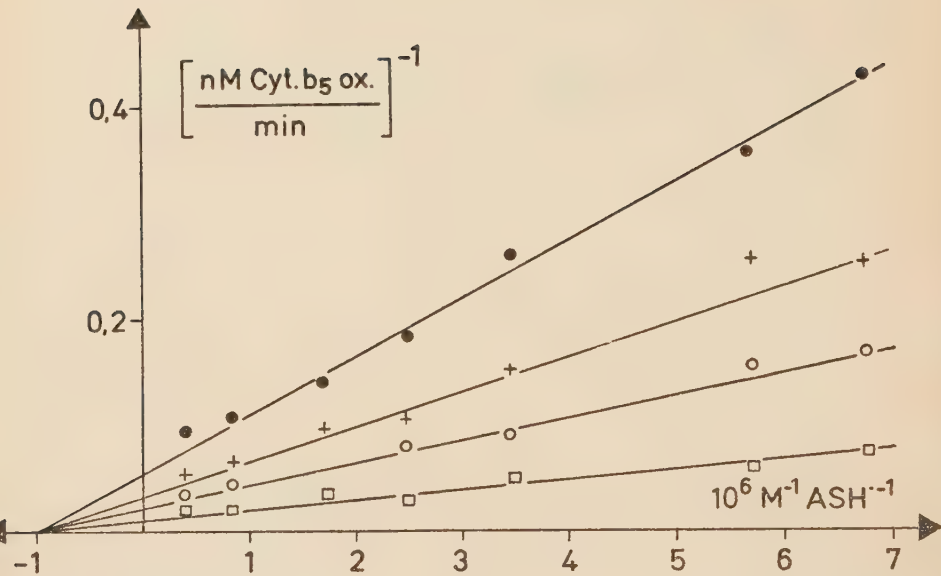


Abb.17: Bestimmung der scheinbaren K_M für ASH^*

bei der Oxydation von isoliertem Cyt b_5
in Anwesenheit von Mikrosomen. Cyt b_5
wurde vorher mit NADH reduziert. Das Ver-
hältnis von isoliertem zu mikrosomalem
Cyt b_5 wurde variiert.

(●●●) ohne Zusatz von isoliertem Cyt b_5 ;

$1,7 \cdot 10^{-6} \text{ M NADH}$

(+++) $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ M Cyt b}_5$ (isoliert);

$3,3 \cdot 10^{-6} \text{ M NADH}$

(ooo) $3,7 \cdot 10^{-6} \text{ M Cyt b}_5$ (isoliert);

$6,7 \cdot 10^{-6} \text{ M NADH}$

(□□□) $10^{-5} \text{ M Cyt b}_5$ (isoliert);

$1,3 \cdot 10^{-5} \text{ M NADH}$

immer: $0,75 \cdot 10^{-6} \text{ M Cyt b}_5$ (mikrosomal:

$1,1 \text{ mg/ml Protein}$); $4-65 \cdot 10^{-3} \text{ M ASH}_2$;

$1-16 \cdot 10^{-3} \text{ M AS}$; $0,1 \text{ M Phosphatpuffer}$; pH 6,4

3.2.5. Abhängigkeit von der Cyt b_5 -Konzentration

Auch bei der Oxydation von reduziertem Cyt b_5 durch ASH^+ bewirkt eine Steigerung der Cyt b_5 -Konzentration in einem Ansatz mit sonst konstanter Konzentration der übrigen Reaktionspartner die Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit mit Annäherung an einen Sättigungswert. So läßt sich, wie Abb. 18 zeigt, entsprechend der Reduktionsreaktion von Cyt b_5 durch ASH_2 (siehe Abb. 8) eine scheinbare K_M für Cyt b_5 ermitteln, die ebenfalls bei $5 \cdot 10^{-6} M$ für Cyt b_5 liegt.

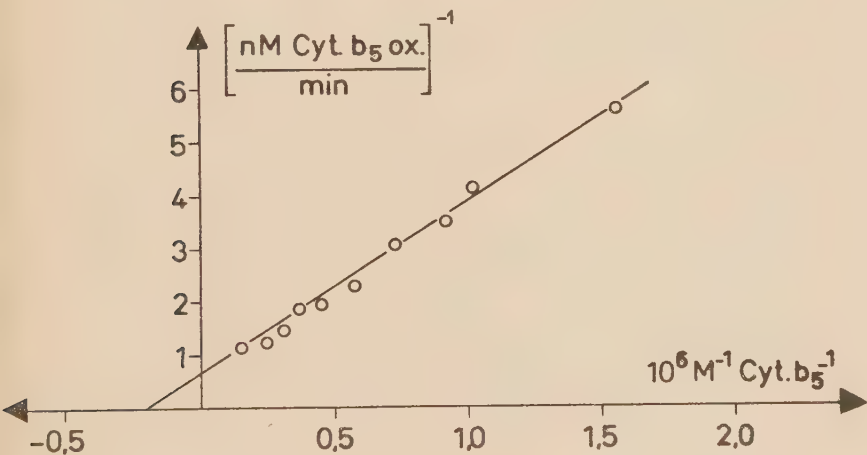


Abb.18: Bestimmung der scheinbaren K_M für Cyt b_5 bei der Oxydation des mit ASH_2 reduzierten Cyt b_5 durch ASH^+
 $0,5-5,5 \cdot 10^{-6} M$ Cyt b_5 (isoliert);
 $0,5 \cdot 10^{-6} M$ Cyt b_5 (in aufgeschlossenen Mikrosomen: $0,46 mg/ml$ Protein); $10^{-2} M$ ASH_2 ;
 $4 \cdot 10^{-3} M$ AS; $0,1 M$ Phosphatpuffer; pH 6,4

3.2.6. Temperaturabhängigkeit

Die Temperatur, die während der Reaktion in dem Ansatz herrscht, bestimmt sehr wesentlich die Geschwindigkeit der Reaktionen. Anhand der Oxydation von Cyt b_5 durch ASH^+ läßt sich zeigen, daß sie bei Temperaturen bis $40^\circ C$ stark ansteigt, über $45^\circ C$ dagegen steil auf Null abfällt (Abb.19). Aus dem Quotienten der Reaktionsgeschwindigkeiten bei $15^\circ C$ und $25^\circ C$ als auch bei $25^\circ C$ und $35^\circ C$ läßt sich der Q_{10} -Wert von 3,0 für diese Reaktion errechnen.

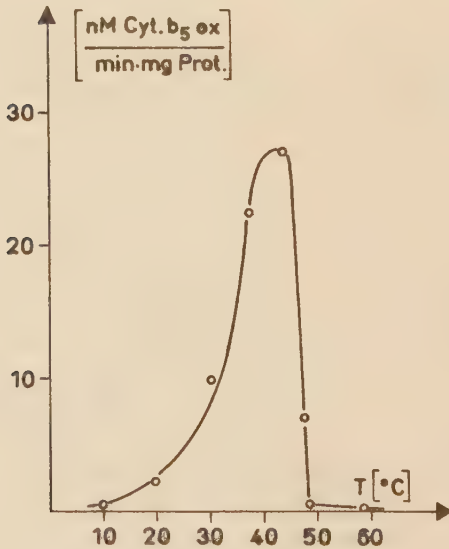


Abb.19: Bestimmung des Q_{10} -Wertes der Oxydation von Cyt b_5 durch ASH^+

$0,9 \cdot 10^{-6} M$ Cyt b_5 (in aufgeschlossenen Mikrosomen: $0,95 \text{ mg/ml}$ Protein); $10^{-2} M$ ASH_2 ; $4 \cdot 10^{-3} M$ AS; $1,7 \cdot 10^{-6} M$ NADH; $0,1 M$ Phosphatpuffer; pH 6,4; Temperatur der Ansätze durch einen Thermostaten mit direktem Anschluß an die Meßküvette eingestellt

Da durch dieses Experiment in Abb. 19 lediglich nachgewiesen wird, daß die Reaktion von Proteinen katalysiert wird, deren Denaturierung die Reaktion unmöglich macht, mußte untersucht werden, ob nicht etwa Cyt b_5 selbst die untersuchten Enzymfunktionen übernehmen kann. Zu diesem Zweck wurde ein Testsystem aufgebaut, in dem isoliertes Cyt b_5 durch die Katalyse der von STRITT-MATTER (16) beschriebenen NADH-Cyt b_5 -Oxydoreduktase in isolierter Form mit NADH reduziert werden kann. Trotz der Anwesenheit von ASH^+ in diesem Testansatz kommt es nicht zu der schnellen Oxydation wie bei Cyt b_5 , das in mikrosomal gebundener Form neben den übrigen Proteinen dieser Fraktion vorliegt. Ein Enzym der Mikrosomenfraktion und nicht das isolierte Cyt b_5 muß demnach den Elektronenübergang zwischen ASH_2 und oxydiertem Cyt b_5 bzw. zwischen reduziertem Cyt b_5 und ASH^+ katalysieren. Ein weiterer Beweis ist die Feststellung, daß Mikrosomen und aufgeschlossene Mikrosomen ihre Fähigkeit, durch Zusatz zum Testsystem (isoliertes Cyt b_5 , isolierte NADH-Cyt b_5 -Oxydoreduktase, NADH, ASH_2 und AS) die schnelle Oxydation wie in Mikrosomen allein zu katalysieren, durch Hitzedenaturierung verlieren (Abb. 20).

3.2.7. Einfluß mikrosomaler Lipide und des Cytoplasma

Das im vorigen Kapitel beschriebene Testsystem dient auch zur Untersuchung der Frage, ob ein Lipidextrakt aus Mikrosomen, wie man ihn nach FOLCH et al (38) gewinnt, die katalysierende Funktion für die Oxydationsreaktion übernehmen kann. Der Zusatz von Cytoplasma oder von Lipidextrakt in einem Konzentrationsverhältnis zu isoliertem Cyt b_5 , das dem Verhältnis in Mikro-

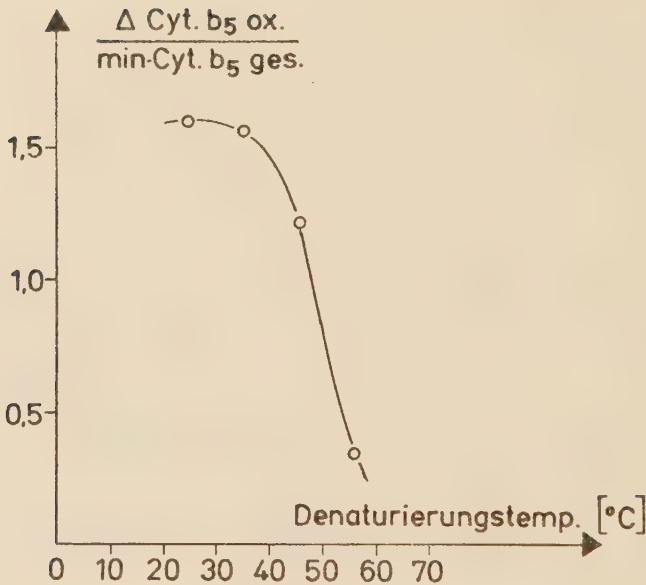


Abb. 20: Hitzedenaturierung aufgeschlossener Mikrosomen durch fünfminütiges Erwärmen auf verschiedene Temperaturen. Aktivität dargestellt als Fähigkeit, reduziertes isoliertes Cyt b_5 durch ASH^+ oxydieren zu lassen
 Testansatz: $0,6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ Cyt b_5 (isoliert); $0,05 \text{ mg/ml}$ einer mit NADH-Cyt b_5 -Oxydoreduktase angereicherten Mikrosomenfraktion; 10^{-2} M ASH_2 ; $4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ AS; $1,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ NADH; $0,1 \text{ M}$ Phosphatpuffer; pH 6,4; 25°C
 Getesteter Zusatz: $0,21 \text{ mg/ml}$ Protein (aufgeschlossene Mikrosomen, jeweils 5min auf verschiedene Temperaturen erwärmt)

somen entspricht, bewirkt aber keine Steigerung der Oxydationsgeschwindigkeit. Genausowenig wird die Reaktionsgeschwindigkeit bei dem Zusatz zu Mikrosomen oder aufgeschlossenen Mikrosomen be-

einflußt, auch wenn vorher über insgesamt fünf Minuten bei 0°C in 15 sec-Abständen ultraschallt wurde.

3.2.8. Einfluß einer Dialyse auf Mikrosomen

Wenn Mikrosomen 24 h bei 4°C gegen mehrfach ausgetauschtes Aqua bidest. dialysiert werden, zeigen sie keinen Unterschied in der Aktivität gegenüber gleichalten Mikrosomenpräparationen, die 24 h bei 4°C aufbewahrt wurden. Der Aktivitätsverlust gegenüber frischen Präparationen beträgt etwa 20%. (1,0 mg/ml Protein; 0,1 M Phosphatpuffer)

3.2.9. Einfluß von Katalase

Da Wasserstoffperoxid als Elektronenakzeptor für reduziertes Cyt b₅ dienen kann (9), mußte geprüft werden, ob nicht etwa durch partielle Reduktion des im Ansatz vorhandenen Sauerstoffs alle Reaktionen wurden aerob durchgeführt - Wasserstoffperoxid entsteht und dieses reduziert Cyt b₅ oxydiert. Ein Zusatz von 1000 U Katalase zu den Ansätzen zeigt keinen Einfluß auf die Oxydation von Cyt b₅ durch ASH[•]. Gleichzeitig ist damit unwahrscheinlich, daß freie Kupferionen an diesem Elektronenübergang von reduziertem Cyt b₅ auf ASH[•] beteiligt sind, da früher (23) gezeigt werden konnte, daß Kupferionen durch die sechs freien SH-Gruppen der Katalase gebunden werden.

3.2.10. Einfluß von Komplexbildnern, Quecksilber(II)ionen und p-Chloromercuribenzoat

Titriplex III und Diäthylthiocarbamat beeinflussen in einer Konzentration von 10⁻³M die Reaktionen nicht.

p-Chloromercuribenzoat in einer Konzentration

von $10^{-3}M$ im Ansatz ($0,5 \cdot 10^{-6}M$ Cyt b_5 in aufgeschlossenen Mikrosomen; $10^{-2}M$ ASH_2 ; $4 \cdot 10^{-3}M$ AS; 0,1M Phosphatpuffer; pH 6,4) hemmt nur die Reduktion von Cyt b_5 durch NADH ($1,7 \cdot 10^{-6}M$ NADH), nicht dagegen die Reduktion mit ASH_2 oder die Oxydation des mit ASH_2 reduzierten Cyt b_5 durch $ASH^{\bullet}$. So kann auch die NADH-Cyt b_5 -Oxydoreduktase als Katalysator für die beschriebenen Elektronenübergänge ausgeschlossen werden, die als Flavoproteid durch p-Chloromercuribenzoat vollständig gehemmt wird.

3.2.11. Versuche mit i- ASH_2 und i-AS

Die beschriebenen Reaktionen lassen sich auch mit i- ASH_2 und i-AS anstatt ASH_2 und AS durchführen. Bei der Oxydationsreaktion des mit i- ASH_2 reduzierten Cyt b_5 durch i- $ASH^{\bullet}$ (als Komproportionierungsprodukt aus i- ASH_2 und i-AS) ergibt sich als scheinbare K_M für i- $ASH^{\bullet}$ ein kleinerer Wert als bei der beschriebenen Reaktion mit $ASH^{\bullet}$, nämlich $K_M = 0,5 \cdot 10^{-6}M$ i- $ASH^{\bullet}$. Dieser Wert gilt auch, wenn Cyt b_5 vor der Zugabe von i-AS mit ASH_2 reduziert worden ist. Andererseits erscheint der alte Wert einer K_M von $10^{-6}M$ für das oxydierende Radikal, wenn Cyt b_5 mit ASH_2 oder i- ASH_2 reduziert worden ist und die Oxydation durch Zugabe von AS ausgelöst wird (Abb. 21). Eine plausible Interpretation für die Ergebnisse dieser Versuche, die am Rande durchgeführt wurden, ist heute noch nicht möglich.

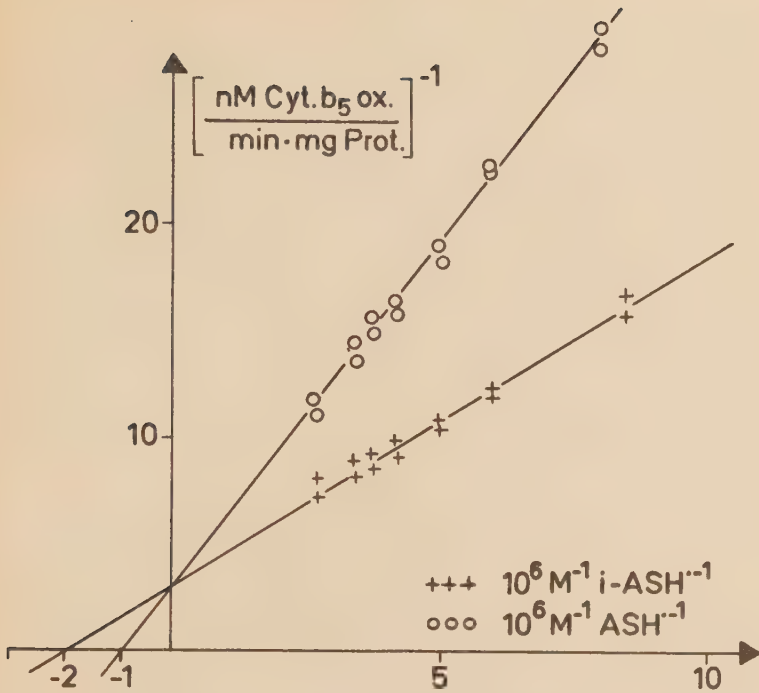


Abb.21: Bestimmung scheinbarer MICHAELIS-Konstanten bei der Oxydation von reduziertem Cyt b_5 . Cyt b_5 wurde zunächst reduziert mit ASH_2 oder i-ASH_2 , die Oxydation wurde ausgelöst durch Zugabe von AS (ooo) oder i-AS (xxx).

$0,9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ Cyt b_5 in aufgeschlossenen Mikrosomen ($1,3 \text{ mg/ml}$ Protein); 10^{-2} M ASH_2 bzw. i-ASH_2 ; $0,4\text{--}8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ AS bzw. i-AS ; $0,1 \text{ M}$ Phosphatpuffer; pH 6,4

4.

DISKUSSION

4.1. Redoxverhalten von ASH_2 und $\text{ASH}^\bullet$

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Arbeiten über das Redoxverhalten von ASH_2 und $\text{ASH}^\bullet$, bei denen gezeigt werden konnte, daß ASH_2 ein Eielektronendonator ist und daß $\text{ASH}^\bullet$ außer bei ihrer Disproportionierungsreaktion in allen untersuchten Fällen nur als Eielektronenakzeptor wirken kann (23).

4.2. Reduktion und Oxydation von Cyt b_5

ASH_2 kann isoliertes Cyt b_5 in einer nicht enzymatischen Reaktion reduzieren; Cyt b_5 , das in mikrosomal gebundener Form vorliegt, wird durch ASH_2 in einer enzymatischen Reaktion reduziert. Entsprechendes gilt für die Oxydation von Cyt b_5 durch $\text{ASH}^\bullet$: bei isoliertem Cyt b_5 liegt eine nicht enzymatische, bei mikrosomal gebundenem Cyt b_5 eine enzymatische Reaktion vor. Reduktion und Oxydation im Gemisch aus isoliertem und mikrosomalem Cyt b_5 sind ebenfalls enzymatische Reaktionen.

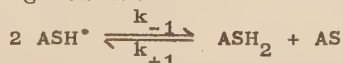
4.2.1. Nicht enzymatische Reaktionen

Die Reduktion von isoliertem Cyt b_5 durch ASH_2 und die Oxydation des vorher mit ASH_2 reduzierten isolierten Cyt b_5 durch $\text{ASH}^\bullet$ gehorchen den Gesetzen einer Reaktion zweiter Ordnung. Sie sind charakterisiert durch eine niedrige Reaktionsgeschwindigkeit. Die Einstellung des Redoxgleichgewichts zwischen den Reaktionspartnern



stellt den experimentellen Zugang zur Bestimmung des Standardredoxpotentials von $\text{ASH}^\bullet/\text{ASH}^\bullet$ dar.

Das Verhältnis von oxydiertem zu reduziertem Cyt b_5 , dessen Standardredoxpotential für die isolierte Form von +0,02V (14,42) bekannt ist, ist abhängig von dem in diesem Ansatz vorliegenden Verhältnis von ASH^+ zu ASH_2 . Davon ausgehend läßt sich nach der PETERSschen Gleichung ein Standardredoxpotential (pH 7,0) für ASH^+/ASH^+ von +0,34V errechnen (47). Für ein Reduktionsmittel ist $E_0' = +0,34V$ ein hoher positiver Spannungswert. Das L(+)-Ascorbat-Ion kann daher nur deshalb als Reduktionsmittel reagieren, da die Konzentration der ASH^+ über die schnelle Disproportionierungsreaktion



sehr klein gehalten wird(49). Außerdem bleibt die AS elektrochemisch inaktiv.

4.2.2. Enzymatische Reaktionen

Wenn Cyt b_5 in mikrosomal gebundener Form vorliegt, läßt es sich mit erheblich höherer Reaktionsgeschwindigkeit durch ASH_2 reduzieren und durch ASH^+ oxydieren. Diese Elektronenübergänge werden den berichteten Ergebnissen zufolge durch ein Enzym der Mikrosomenfraktion katalysiert.

Als Beweis für die Existenz dieses Proteins sind die folgenden Beobachtungen anzusehen:

a) Proteinabhängigkeit

Die Geschwindigkeit der untersuchten Reaktionen ist linear abhängig von der Proteinkonzentration, wenn die Konzentrationsänderung des reduzierten bzw. oxydierten Cyt b_5 auf den Gesamt-Cyt b_5 - Gehalt bezogen wird. Mit diesem Bezug wird rechnerisch eine Konstanz der Cyt b_5 -Konzentration hergestellt, was wegen des festliegenden Verhältnisses des mikrosomalen Cyt b_5 zur übrigen Proteinfraction sonst nicht möglich ist. Cyt b_5 er-

scheint somit als zweites Substrat des postulierten Enzyms neben ASH_2 bzw. ASH° . Bei den verwendeten Cyt b_5 -Konzentrationen arbeitet dieses Enzym, wie aus Abb. 8 und 18 ersichtlich, nicht im Sättigungsbereich. Eine Änderung der Cyt b_5 -Konzentration beeinflusst also noch in annähernd linearer Abhängigkeit die Reaktionsgeschwindigkeit.

b) Hitzelabilität

Hitzedenaturierung der mikrosomalen Proteine macht die Katalyse der beschriebenen Reaktionen mit dem intakten Cyt b_5 unmöglich. Bei der Bestimmung der Temperaturabhängigkeit läßt sich für die Oxydationsreaktion ein Q_{10} -Wert von etwa 3,0 bestimmen.

c) Kinetische Daten

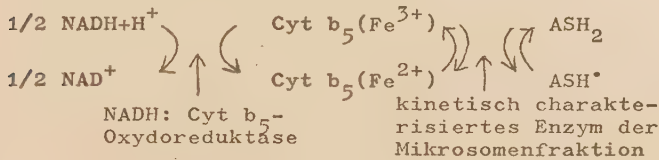
Die kinetischen Daten gehorchen den Bedingungen einer MICHAELIS-MENTEN-Kinetik und erlauben durch die Auftragungsweise nach LINEWEAVER und BURK die Bestimmung scheinbarer MICHAELIS-Konstanten. Sie betragen für ASH_2 bei der Reduktionsreaktion $1,2 \cdot 10^{-2} \text{M}$, für ASH° bei der Oxydationsreaktion 10^{-6}M und für Cyt b_5 jeweils $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$. Wichtig ist insbesondere die Konstanz dieses Wertes für ASH° bei der Oxydationsreaktion, wenn bei verschiedenen Enzym- oder Substratkonzentrationen, bei verändertem pH-Wert, mit verschiedenen Reduktionsmitteln und mit unterschiedlichen Cyt b_5 -Präparationen gearbeitet wird.

4.3. Beziehung zum mikrosomalen Elektronentransport

Die in vitro möglichen nicht enzymatischen Reaktionen zwischen isoliertem Cyt b_5 und ASH_2 bzw. ASH° werden in vivo durch ein Enzym der Mikrosomenfraktion katalysiert, wie die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten vom Zusatz

mikrosomalen Proteins zeigt.

Die Größenordnung der scheinbaren MICHAELIS-Konstanten von $10^{-6}M$ für $ASH^{\bullet}$ läßt die Oxydation von reduziertem Cyt b_5 durch $ASH^{\bullet}$ als notwendige Reaktion des mikrosomalen Stoffwechsels für die Reduktion von $ASH^{\bullet}$ zu ASH_2 erscheinen. Es ist möglich, diese Oxydationsreaktion als nicht limitierenden Teilschritt (39) oder als zusätzlichen Weg in dem mikrosomalen System der Elektronenübertragung auf $ASH^{\bullet}$ neben der NADH: Semidehydro-L(+)-ascorbat-Oxydoreduktase zu deuten.



Dieses Schema entspricht dem besprochenen System einer Elektronentransportkette mit der Funktion der Erhaltung der Ascorbinsäure in reduzierter Form. Durch die vorliegenden Untersuchungen ist auch der letzte Schritt, der Elektronenfluß von reduziertem Cyt b_5 auf $ASH^{\bullet}$, im Sinne einer enzymatischen Reaktion geklärt.

Der Umkehrung dieses letzten Reaktionsschrittes, nämlich der Reduktion von Cyt. b_5 durch ASH_2 , scheint keine Bedeutung im mikrosomalen Stoffwechsel zuzukommen, wie die scheinbare MICHAELIS-Konstante von $1,2 \cdot 10^{-2}M$ für ASH_2 andeutet.

5.

ZUSAMMENFASSUNG

Die laufende Registrierung des Gehaltes einer Mikrosomenfraktion an reduziertem Cytochrom b_5 mit einem Differenzspektrophotometer macht es möglich, kinetische Daten für Reaktionen zwischen Cytochrom b_5 , L(+)-Ascorbinsäure und Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure zu bestimmen.

Cytochrom b_5 wird in Mikrosomen enzymatisch durch L(+)-Ascorbinsäure reduziert und durch Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure oxydiert. Die Hitzedenaturierbarkeit, die lineare Proteinabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten und eine scheinbare MICHAELIS-Konstante von $10^{-6}M$ für Semidehydro-L(+)-ascorbinsäure bei der Oxydation von Cytochrom b_5 beweisen die Existenz dieses Enzyms und charakterisieren es kinetisch.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) KEILIN, D. und HARTREE, E.F.
Proc. Roy. Soc. (London) B 129, 277 (1940)
- (2) STRITTMATTER, C.F. und BALL, E.G.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 38, 55 (1952)
- (3) PAPPENHEIMER, A.M. und WILLIAMS, C.M.
J. biol. Chemistry 209, 915 (1954)
- (4) CHANCE, B. und WILLIAMS, G.R.
J. biol. Chemistry 209, 945 (1954)
- (5) STRITTMATTER, P. und VELICK, S.F.
J. biol. Chemistry 221, 253 (1956)
- (6) GARFINKEL, D.
Arch. Biochem. Biophysics 71, 111 (1957)
- (7) RAW, J., MOLINARI, R., DO AMARAL, D.F. und
MAHLER, H.R.
J. biol. Chemistry 233, 225 (1958)
- (8) STRITTMATTER, P.
J. biol. Chemistry 235, 2492 (1960)
- (9) STRITTMATTER, P.
in: "The Enzymes" Vol. 8, p. 113
(Boyer, P.D., Lardy, H., Myrbäck, K. eds.)
Academic Press, New York (1963)
- (10) STRITTMATTER, P.
in: "Methods in Enzymology" Vol. X, p. 553
(Estabrook, R.W. and Pullman, M.E. eds.)
Academic Press, New York (1967)
- (11) POLTORATSKY-BOIS, R. und EHRENBERG, A.
Acta Chem. Scand. 20, 1999 (1966)
- (12) KAJIHARA, T. und HAGIHARA, B.
J. Biochem. 63, 453 (1968)
- (13) ITO, A. und SATO, R.
J. biol. Chemistry 243, 4922 (1968)
- (14) VELICK, S.F. und STRITTMATTER, P.
J. biol. Chemistry 221, 265 (1956)
- (15) KLINGENBERG, M.
Arch. Biochem. Biophysics 75, 376 (1958)
- (16) STRITTMATTER, P. und VELICK, S.F.
J. biol. Chemistry 221, 277 (1956)

- (17) SZENT-GYÖRGYI, A.
J. biol. Chemistry 90, 385 (1931)
- (18) KERN, M. und RACKER, E.
Arch. Biochem. Biophysics 48, 235 (1954)
- (19) NASON, D., WOSSLAIT, W. und TERELL, A. L.
Arch. Biochem. Biophysics 48, 233 (1954)
- (20) STAUDINGER, H. J., KRISCH, K. und LEONHÄUSER, S.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 92, 195 (1961)
- (21) YAMAZAKI, J., MASON, H. S. und PIETTE, L.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1, 336 (1959)
- (22) v. FOERSTER, G., WEIS, W. und STAUDINGER, H. J.
Liebigs Ann. Chem. 690, 166 (1965)
- (23) WEIS, W., ZUBRZYCKI, Z. und STAUDINGER, H. J.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349,
279 (1968)
- (24) MAPSON, L. W.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 92, 21 (1961)
- (25) KRISCH, K. und STAUDINGER, H. J.
Biochem. Z. 331, 195 (1959)
- (26) FRUNDER, H., BLUME, E. und KLUGE, H.
Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)
65, 146 (1962)
- (27) DEGWITZ, E., SCHNEIDER, W. und STAUDINGER, H. J.
in: Wiss. Veröfftl. Dtsch. Ges. Ernährung
Bd. 14, S. 35
Verlag Dr. D. Steinkopff, Darmstadt (1965)
- (28) OSHINO, N., IMAI, Y. und SATO, R.
Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)
128, 13 (1966)
- (29) STAUDINGER, H. J. und WEIS, W.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.
337, 284 (1964)
- (30) POLTORATSKY-BOIS, R. und CHAIX, P.
Bull. Soc. Chim. Biol. 46, 867 (1964)
- (31) LUMPER, L. Biochem. Inst. Univ. Gießen
Private Mitteilung
- (32) TAKESUÉ, S. und OMURA, T.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 723 (1968)

- (33) STRITTMATTER, P. und VELICK, S.F.
J. biol. Chemistry 228, 785 (1957)
- (34) SCHNEIDER, W.C. und HOGEBOOM, G.H.
J. biol. Chemistry 183, 123 (1950)
- (35) LUMPER, L., SCHNEIDER, W. und STAUDINGER, H.J.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.
348, 323 (1967)
- (36) GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J. und DAVID, M.M.
J. biol. Chemistry 177, 751 (1949)
- (37) MODIRZADEH, J. und KAMIN, H.
Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)
99, 205 (1965)
- (38) FOLCH, J., LEES, M. und STANLEY, G.H.S.
J. biol. Chemistry 226, 497 (1957)
- (39) SCHNEIDER, W., STAUDINGER, H.J. und WEIS, W.
Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)
82, 548 (1964)
- (41) OZOLS, J. und STRITTMATTER, P.
J. biol. Chemistry 243, 3376 (1968)
- (42) KAWAI, Y., YONEYAMA, Y. und YOSHIKAWA, H.
Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)
67, 522 (1963)
- (43) EVERLING, F.B., WEIS, W. und STAUDINGER, H.J.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.
350, 886 (1969)
- (44) KRISCH, K. und STAUDINGER, H.J.
Biochem. Z. 331, 37 (1958)
- (45) CHANCE, B. und WILLIAMS, G.R.
J. biol. Chemistry 217, 395 (1955)
- (46) RAW, J. und COLLI, W.
Nature 184, 1798 (1959)
- (47) KERSTEN, W., Schmidt, H. und STAUDINGER, H.J.
Biochem. Z. 326, 469 (1955)
- (48) NAZEMI, M. und STAUDINGER, H.J.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.
349, 345 (1968)
- (49) v. FOERSTER, G., WEIS, W. und STAUDINGER, H.J.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.
344, 217 (1966)

LEBENS LAUF

Am 23. Januar 1946 wurde ich als Sohn des Richters Rudolf Everling und seiner Frau Irmgard, geb.

Wüst in Nidda geboren.

Ab Ostern 1952 besuchte ich die Volksschule Nidda und wechselte nach vier Jahren in das Gymnasium Nidda. Für die Oberstufe wählte ich den mathematisch - naturwissenschaftlichen Zweig und bestand im Februar 1965 die Reifeprüfung.

Da ich vom Militärdienst zurückgestellt wurde, begann ich im Sommersemester 1965 mein Medizinstudium an der Justus Liebig-Universität in Gießen. Hier legte ich die Naturwissenschaftliche und die Ärztliche Vorprüfung im April 1966 bzw. im Oktober 1967 ab.

Im Januar 1968 gab mir Professor Dr. Staudinger die Möglichkeit, die vorliegende Doktorarbeit in seinem Institut zu verfassen.

Mein Medizinisches Staatsexamen bestand ich im Januar 1971.

